淡色库蚊中抗性相关羧酸酯酶的纯化及其生化性质

梁 军*，沈建华**，林国芳，符文俊
（中国科学院上海昆虫研究所，上海 200025）

摘要：在库蚊 *Culex pipiens* 品系中，非专一性酯酶活性的升高是对有机磷杀虫剂产生抗性的重要机理之一。应用 SDS/PAGE，比较淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 抗敌百虫品系（RD）、敏感型品系（S）和抗苄呋菊酯品系（PY）中可溶性总蛋白质带型，显示 RD 中含有一条特异蛋白带，其它两个品系中未检出。在 RD 成虫匀浆液总蛋白中含量高达 2.1%。分子量测定为 66 kD。应用柱层析法分离得到了较纯的纯品。以 α-NA 为底物测得 K_m = 64.1 mmol/L，V_{max} = 249.8 mmol/(L·mg·min)。与羧酸酯酶相比较：其 K_m 值小于已报道的抗性品系及非抗性品系 A-酯酶和 B-酯酶。V_{max}值比已报道抗性品系 A-酯酶低，比 B-酯酶高。较高浓度的敌百虫并不能抑制其酶活，属于 A-酯酶。在昆虫体内可能主要通过结合隔离作用（sequestration）提高昆虫对有机磷的耐受性，对有机磷杀虫剂水解作用的可能性也不能排除。

关键词：淡色库蚊；抗药性；羧酸酯酶；纯化；酶动力学；结合隔离作用
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2001）02-0161-09

淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 是斑氏丝虫病及乙型脑炎的重要媒介昆虫之一。早在 60 年代，上海地区就报告了淡色库蚊对敌百虫产生低度抗性。迄今国内外研究表明：对有机磷杀虫剂产生抗性的昆虫中，其抗药性与羧酸酯酶有较大的相关性[1~5]，抗性越强羧酸酯酶的活力越高。由于生化技术和抗药性认识的原因，人们在研究抗性蚊虫品系中羧酸酯酶酶学性质时，一直以蚊虫匀浆液为酯酶酶源。直到 80 年代末，不同的学者[6~8]开始用柱层析法从尖音库蚊五带亚种 *Culex pipiens quinquefasciatus* 和致倦库蚊 *Culex fatigans* 提纯羧酸酯酶并研究其生化性质。但是，国内外均未报道与淡色库蚊有关的工作。本文作者对淡色库蚊抗敌百虫品系（RD）的 66 kD 羧酸酯酶进行提纯，并开展了酶学等方面的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

化学试剂：α-乙酸萘酯（α-naphthol acetate，α-NA）由上海第一化工试剂厂生产；敌百虫

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39470115）
* 目前工作单位：中国科学院上海生物化学研究所，邮编 200031
** 联系作者
收稿日期：1999-05-04；接受日期：1999-12-21

和DEAE-cellulose（DE-5L）购自Sigma公司（St. Louis，Mo.，U.S.A.），Phenyl-sepharose（CL-4B），由Pharmacia（Uppsala，Sweden）生产。

蚊虫（淡色库蚊）品系：（1）敏感型品系（S）：于50年代采自上海闸北区。之后室内进行继代人工饲养，未与任何种类的杀虫剂接触。对敌百虫LC_{50}为0.307×10^{-6} g/mL，对苄呋菊酯LC_{50}为0.156×10^{-6} g/mL。（2）抗敌百虫品系（RD）：于1972年采自上海闸北区，野外群体初始抗性为敏感型品系（S）的10倍。在实验室用敌百虫进行长期选育（隔代筛选一次），对敌百虫LC_{50}为20×10^{-6} g/mL 。（3）抗苄呋菊酯品系（PY）：由敏感型品系在实验室用苄呋菊酯进行长期选育（隔代筛选一次），对苄呋菊酯LC_{50}为80×10^{-6} g/mL。

1.2 方法

1.2.1 蚊虫粗提液：饲养的蚊虫待成虫羽化4～5天后，即在－80℃冰箱中迅速冷冻致死。称取0.2 g成虫，加入1 mL pH 7.2的20 mmol/L磷酸缓冲液，冰浴中用玻璃匀浆器匀浆。Beckman离心机上4℃连续离心3次：5 000 r/min，15 min；10 000 r/min，20 min；15 000 r/min，30 min；取上清液作电泳和纯化用。

1.2.2 SDS/PAGE：依Laemmli[9]方法。分子量标记为：兔磷酸化酶B，97 kD；牛血清白蛋白，66 kD；兔肌动蛋白，43 kD；鸡蛋清溶菌酶，14 kD。

1.2.3 等电聚焦（IEF）：在4℃条件下，Bio-Rad IEF电泳仪上进行等电聚焦（pH 3.5～10）（阳极：1 mol/L H_3PO_4；阴极：1 mol/L NaOH），两性电解质购自Bio-Rad公司。电泳功率为20 W，最大电压为2 000 V，最大电流为20 mA。通电4 h。

1.2.4 酶活性显色：将12.5 mg α-NA及12.5 mg β-NA完全溶解于4 mL丙酮（4%，W/V）中，再将50 mg Fast Blue RR溶于其中，用pH 7.2的20 mmol/L磷酸缓冲液定容至100 mL。室温下浸泡凝胶2 h即可显色。

1.2.5 蛋白浓度测定：蛋白浓度测定采用Lowry[10]法。以牛血清白蛋白（BSA）标定。

1.2.6 疏水层析分离：选用10 cm×1 cm Phenyl-Sepharose（CL-4B）层析柱，4℃下进行柱层析。以40%饱和度的$(NH_4)_2SO_4$平衡柱床。在15 mL/h流速下进行阶段洗脱：以40%（流分Ⅰ）、30%（流分Ⅱ）、20%（流分Ⅲ）、10%（流分Ⅳ）、0.5%（流分Ⅴ）饱和度的$(NH_4)_2SO_4$分别进行洗脱，每一流分均以2倍柱床体积洗脱；之后用20 mmol/L pH 7.2的磷酸缓冲液（流分Ⅵ）洗脱，再用含0.2%（流分Ⅶ）、0.5%（流分Ⅷ）、1%（流分Ⅸ）、2%（流分Ⅹ）（W/V）乙二醇的20 mmol/L pH 7.2的磷酸缓冲液作为洗脱剂进行洗脱。SDS/PAGE检测结果。PEG 20 000浓缩蛋白。

1.2.7 离子交换柱分离：装5 cm×1 cm DEAE-Cellulose（DE-5L）层析柱。4℃下，20 mol/L pH 7.2的磷酸缓冲液平衡10个柱体积。加入样品。先用20 mmol/L pH 7.2的磷酸缓冲液（流分Ⅰ）洗脱2个柱体积，再依次用含有10 mmol/L（流分Ⅱ）、50 mmol/L（流分Ⅲ）、100 mmol/L（流分Ⅳ）、500 mmol/L（流分Ⅴ）、1 mol/L（流分Ⅵ）NaCl的20 mmol/L pH 7.2的磷酸缓冲液进行阶段洗脱，收集每一洗脱浓度下的流出液为一个流分；蛋白质检测及浓缩同上。

1.2.8 FPLC（fast protein liquid chromatography）：依FPLC Manual（Pharmacia，Uppsala，Sweden）操作，层析柱柱床体积为：70 mL。将样品浓缩，取0.5 mL上样，用20 mmol/L pH 7.2的磷酸缓冲液洗脱蛋白质。调节流速为：1 mL /min，用UV检测器在280 nm波长下检测蛋白峰。

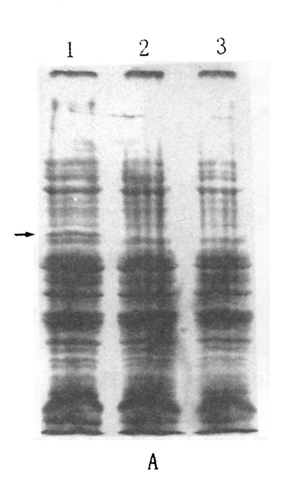
1.2.9 酶活性测定方法：依 Hφjring[11]方法测定酶活性。以 α-NA 为底物，反应体系包含：0.024 mmol/L～1.2 mmol/L 底物（溶于丙酮中），5×10^{-5} mol/L 毒扁豆碱，以 20 mmol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液补充反应体系，使总体积为 1.5 mL。加入酶液后，迅速摇匀，37℃ 反应 3 min。320 nm 下测光吸收值变化（Beckman DU7500 分光光度计）。以不含酶液的反应体系为对照，测定其反应速度。

1.2.10 酶抑制动力学：将不同浓度的敌百虫（50～500 nmol）加入到未加酶液的反应体系中，预先保温 5 min。之后加入定量的酶液，迅速摇匀；320 nm 下测光吸收值变化（Beckman DU7500）。作酶活性变化曲线。

2 结果

2.1 SDS/PAGE

用 RD、S、PY 三品系的可溶性总蛋白做 SDS/PAGE（图 1：A）。结果显示：RD 品系中含有一条特异蛋白带，占匀浆液总蛋白的 2.1%，在 S 和 PY 品系中未见到这一蛋白带。而三品系中其它蛋白带的位置与浓度差异非常小。以标准分子量标记对照，测得蛋白迁移率（*Rf*）为：0.49，分子量为：66 kD（图 1：B）。



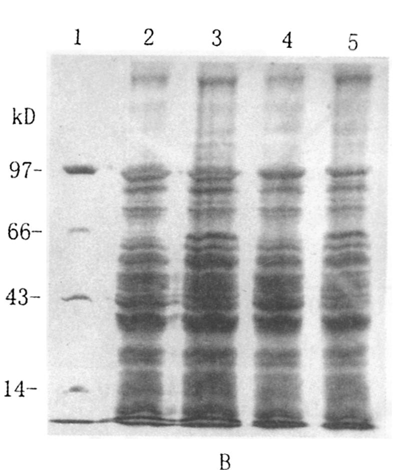


图 1　淡色库蚊 S 品系、RD 品系及 PY 品系的 SDS/PAGE 图谱

Fig. 1　SDS/PAGE spectrum of *Culex pipiens pallens* strain，RD strain，PY strain

A：1. RD 品系 RD strain；2. PY 品系 PY strain；3. S 品系 S strain；

B：1. 分子量标记 molecular weight marker；2，4. S 品系 S strain；3，5. RD 品系 RD strian

2.2 66 kD 蛋白的分离纯化

Phenyl-Sepharose 的疏水层析表明，最初的 10 mL 预洗脱液中在电泳上能检测到大量杂蛋白的存在。随着洗脱液的增加，蛋白含量逐渐减少。多数杂蛋白与凝胶的结合能力很弱。66 kD 蛋白与凝胶的结合较为紧密，随着磷酸缓冲液中 $(NH_4)_2SO_4$ 饱和度的下降，结合能力逐渐下降，直至洗脱液中无 $(NH_4)_2SO_4$ 时（流分Ⅵ）才被洗脱下来（图 2）。

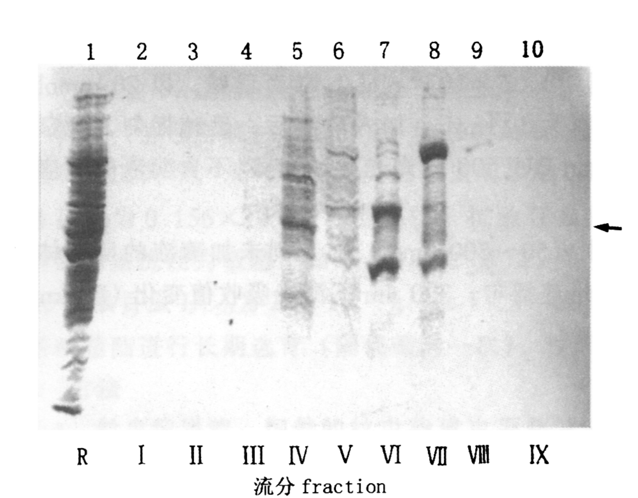


图 2 用 SDS/PAGE 检测 Phenyl-Sepharose 柱层析洗脱效果

Fig. 2 Elution bands of Phenyl-Sepharose chromatography examined by SDS/PAGE

将样品进行 DEAE-Cellulose（DE-5L）柱层析（图 3～4）。66 kD 蛋白质主要分布在流分Ⅰ、Ⅱ（图 3：1，10；图 4：4）。可见此蛋白对 DEAE 的结合能力非常小，在洗脱初始阶段即被洗脱下来。FPLC（分子筛）（图 4）提示：提纯后的蛋白质与匀浆液中的原蛋白条带在电泳上的位置相同，蛋白峰的洗脱体积为 40～42 mL（与标准 66 kD 球蛋白洗脱体积近似）因此它是一个单亚基蛋白质。故而所提纯的蛋白仅含一个 66 kD 的亚基。

2.3 等电聚焦

在 4℃ 条件下，Bio-Rad IEF 电泳仪上进行等电聚焦（pH 3.5～10），测得 66 kD 蛋白的等电点为 4.6。

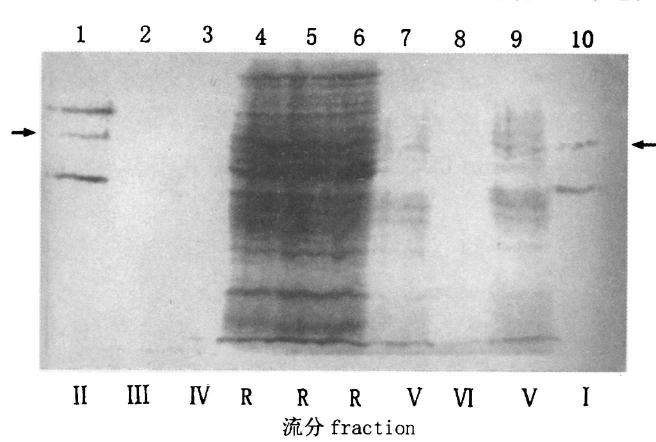


图 3 用 SDS/PAGE 检测 DEAE-Cellulose 柱层析洗脱效果

Fig. 3 Elution bands of DEAE-Cellulose chromatography examined by SDS/PAGE

2.4 酶动力学

2.4.1 产物浓度标准曲线：将不同浓度的产物，α-萘酚（0～120 nmol）加入到 20 mmol/L pH 7.2 的磷酸缓冲液中，保持总体积为 1.5 mL。在 320 nm 下测定光吸收值。以产物量为横坐标，OD_{320}值为纵坐标作标准曲线（图 5）。

2.4.2 66 kD蛋白：将 2.25 mmol α-NA 和提纯的 66 kD 蛋白加入反应液中，连续记录不同时间下的 320 nm 光吸收值作 V-T 图（图 6）。取不同浓度的底物（0.024～1.2 mmol/L）加入到反应体系中，37℃ 下反应 3 min，测 320 nm 光吸收值。计算酶反应速度。66 kD 蛋白的双倒数作图（图 7）表明：$K_m = 64.1$ mmol/L，$V_{max} = 249.8$ mmol/(L·mg·min)。

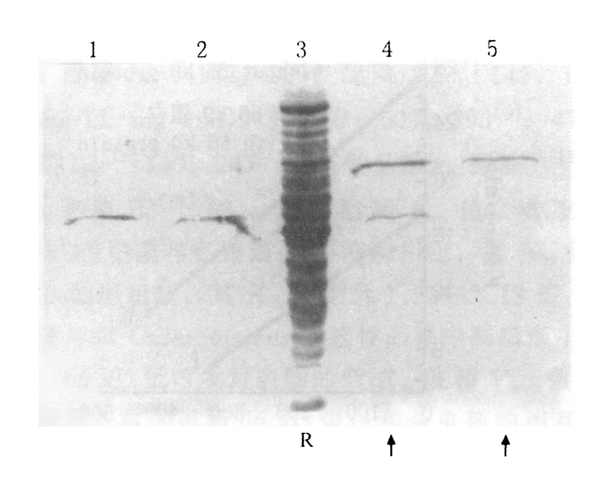


图4　用SDS/PAGE检测FPLC柱层析洗脱效果

Fig. 4　Elution bands of FPLC chromatography examined by SDS/PAGE

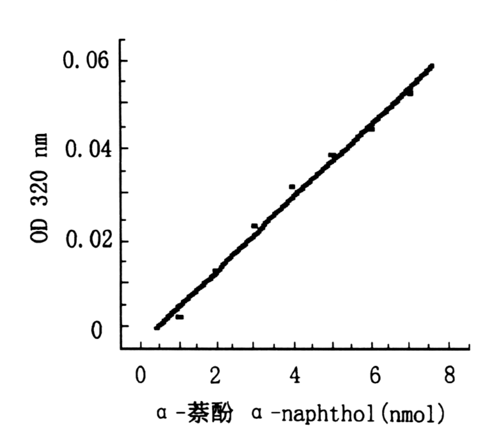


图5　产物浓度标准曲线

Fig. 5　Standard curve of product

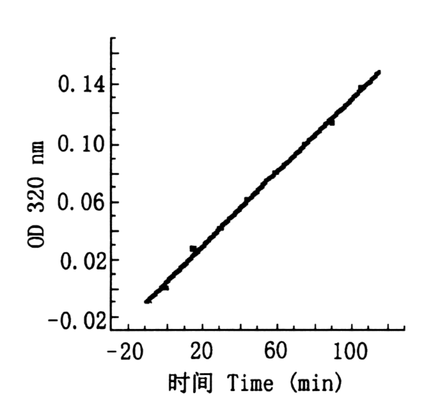


图6　66 kD蛋白酯酶活力随时间变化曲线

Fig. 6　Time-activating curve of 66 kD protein

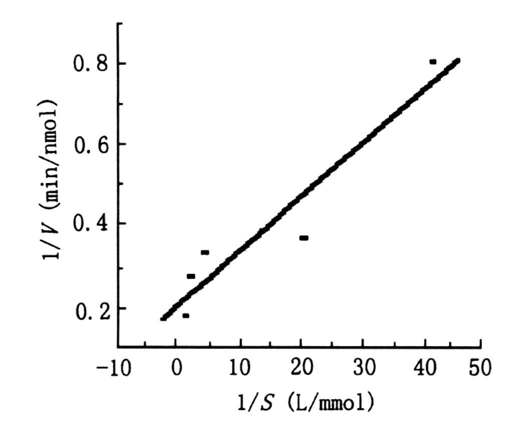


图7　66 kD蛋白双倒数作图

Fig. 7　Double reciprocal plot of 66 kD protein

0.024～1.2 mmol/L底物，1%丙酮

0.024～1.2 mmol/L substrate, 1% acetone

2.4.3　有机磷杀虫剂对酯酶活性的抑制：将不同浓度的敌百虫加入到反应体系中，37℃下保温5 min。之后加入底物和66 kD蛋白迅速摇匀，待反应3 min后测320 nm光吸收值。以敌百虫含量为横坐标，酶反应速度为纵坐标作酶活力变化曲线（图8)。用相同的反应体系测定敌百虫对蚊虫匀浆液的酯酶酶活力变化曲线（图9)。

结果显示66 kD蛋白几乎不受敌百虫的抑制。蚊虫匀浆液总酶活力随着敌百虫浓度的增加呈线性下降状态。将提纯的66 kD蛋白（0.018 mg）预先与含敌百虫的反应液在37℃下保温5 min。之后测定蚊虫匀浆液总酶液的反应速度，作酶活力变化曲线（图9：曲线Ⅱ)。由图9可知：蚊虫匀浆总酶活力半抑制常数（IC_{50}）为270 nmol敌百虫；66 kD蛋白存在下蚊虫匀浆总酶活力半抑制常数（IC_{50}）为345 nmol敌百虫。

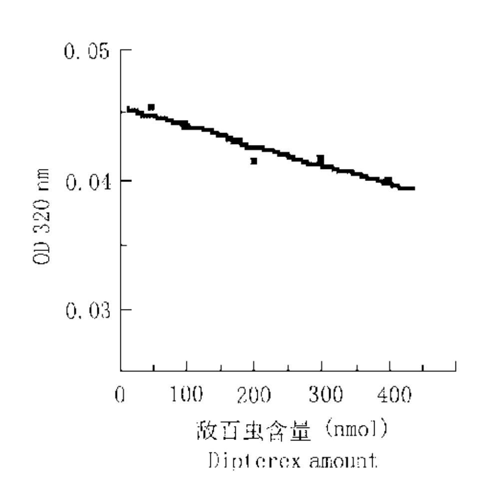


图 8 不同含量敌百虫对 66 kD 蛋白酯酶活力的影响

Fig.8 Effect of dipterex on 66 kD protein esterase activity

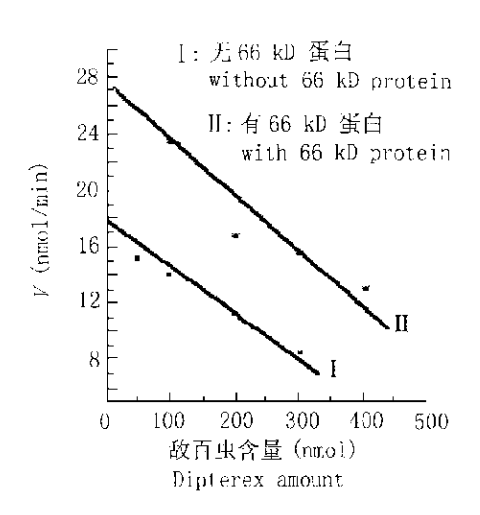


图 9 敌百虫含量对 RD 品系蚊虫匀浆总酯酶活力的影响

Fig.9 Effect of dipterex on total esterase activity with or without 66 kD protein in RD strain

3 讨论

3.1 应用 SDS/PAGE 显示 66 kD 蛋白的存在

RD 品系中含有一条特异蛋白带，含量为总蛋白量的 2.1%，迁移率为 0.49，分子量为 66 kD。以下均称为 66 kD 蛋白。在 S 和 PY 品系中未见其存在。

RD 品系与敏感型品系比较，羧酸酯酶的活力高 10 倍左右，对敌百虫的抗性高 170 倍以上，并随着对敌百虫抗性水平的升降而增减。无论胆碱酯酶或是磷酸酯酶活力，在二品系中均未见到明显差异，且两者的胆碱酯酶对敌百虫和敌敌畏的敏感度相似[12]。因此实验用的二品系的主要差异在于羧酸酯酶。因此 RD 品系中 66 kD 特异性蛋白极有可能与蚊虫抗药性有关。

3.2 66 kD 蛋白的分离与纯化

为探索 66 kD 蛋白与淡色库蚊抗药性的关系，我们对它进行了分离提纯。目前国内学者进行蚊虫抗性品系羧酸酯酶的分离纯化主要采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法[13]或淀粉凝胶电泳法。但是这两种方法仅能得到少量纯品，且成本高。欲进行酶动力学方面的研究需要大批量提纯酯酶，因此我们选用了 Phenyl-Sepharose 柱和 DEAE-Cellulose 柱，以及 FPLC（分子筛）对 66 kD 蛋白进行分离纯化。结果表明它是一个单亚基蛋白质。

3.3 66 kD 蛋白的部分生化性质及其与淡色库蚊抗药性的关系

提纯的 66 kD 蛋白质 pI 值为 4.6。迄今为止，已发表的酯酶 A 和酯酶 B，一般都有较低的 pI 值[2,14]。这是由于酯酶中酸性氨基酸所占的比例较多的缘故：例如，Mane[15]报道了 Est-6 酯酶中富含谷氨酸和门冬氨酸（占总量的 23%），其 pI 值为 4.5。

酶学动力学研究双倒数作图表明其：$K_m = 64.1$ mmol/L，$V_{max} = 249.8$ mmol/（L·mg·min）。敌百虫几乎不能够抑制它的活性，依据 Aldridge[16]分类法，它属于 A-酯酶。

不同作者报道了不同的抗性相关酯酶酶动力学参数。A-酯酶的 K_m 值（单位：mmol/L）为：酯酶 A2[6] 182，209；酯酶 A2[17] 145，119（非抗性品系）。其对应的 V_{max} 值（单位：mmol/(L•mg•min)）分别为：609，893[6]；472[17]。B-酯酶的 K_m 值为：酯酶 B2[6] 85，90；酯酶 B2[17] 140，247（非抗性品系）；酯酶 B[18] 270；其对应的 V_{max} 值依次为：酯酶 B2[6] 99，70；酯酶 B2[18] 63 。其它酯酶 K_m 值：MCE-Ⅱ[5] 76.4；羧酸酯酶[18]：400。本文报道的 66 kD蛋白质与已报道的 A-酯酶相比，其 K_m 值约低 2.26～3.26 倍，V_{max} 值约低 1.9～3.57；与 B-酯酶比较，其 K_m 值约低 1.32～2.18 倍，V_{max} 值提高 2.52～3.96 倍。同时其 K_m 值比尖音库蚊 *Culex pipiens* 非抗性品系中酯酶低 1.18～3.86 倍。

66 kD 蛋白质对底物的低 K_m 值和 V_{max} 值，说明它与底物的亲和力很高，且水解活力相对较弱。故而推断 66 kD 蛋白和杀虫剂的相互关系主要是结合隔离作用（sequestration）。由于它在可溶性蛋白质总量中的含量非常高，为结合隔离作用提供了物质基础。图 9 显示 66 kD 蛋白存在时，蚊虫匀浆总酶活力 IC_{50} 常数降低了 75 mmol。亦为 66 kD 蛋白与底物发生的结合隔离作用提供了一个有力的证据。

Devonshire[19]研究了从桃蚜中分离的 E4 酯酶，发现它对有机磷杀虫剂的结合隔离作用远远大于对它的水解作用。致倦库蚊品系粗匀浆液中的 B1 酯酶[20]可被氯蜱氧磷抑制，却不能水解它，而是与之发生结合隔离作用。进一步的研究表明，其抗药性亦与结合隔离作用相关。Jayawardena[14]报道抗马拉硫磷品系 *C. pipiens quinquefasciatus* 中，A2 酯酶和 B2 酯酶与马拉氧磷的结合力很高并形成酶-有机磷杀虫剂复合物，但其分解常数非常低。作者认为，A2 酯酶和 B2 酯酶在抗性品系中的主要生理功能是与有机磷杀虫剂发生结合隔离作用。我们提纯的 66 kD 蛋白质在 RD 品系中亦可能以这种机制发挥抗药性作用。

乔传令[21]的工作认为，在北京郊区采集的抗有机磷蚊虫中存在有 B1 酯酶的扩增并与抗药性有关。然而上海地区 RD 品系抗药性存在着不同的机制。陈巧云[22]的工作表明：PY 品系 DNA 含有与 B1 基因同源或部分同源的序列，而 RD 和 S 品系 DNA 无 B1 基因的同源序列。故而 RD 品系抗药性与 B1 基因扩增相关性不大。提纯的 66 kD 蛋白质有酯酶活性且属于 A-酯酶。因此我们认为，上海地区淡色库蚊 RD 品系中的抗药性与 66 kD 蛋白有直接的相关性，与 B1 酯酶基因扩增无关。

致谢　中国科学院上海生物化学研究所许根俊院士在工作中给予大力支持和指导。中国科学院上海昆虫研究所分子毒理组，中国科学院上海生物化学研究所 301 组和 320 组的全体老师、同事和同学在实验工作中及论文的整理工作中给予了热忱帮助和支持。特此致谢！

参　考　文　献（References）

［1］ Wirth M C. Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): role in organophosphate resistance and linkage. J. Med. Entomol., 1990, 27: 202～206

［2］ Sreerama L, Veerabhadrappa P S. Purification and properties of carboxylesterase from the mid-gut of the termite *Odontotermes horni* W. Insect Biochem., 1991, 21 (8): 833～844

［3］ Villani F, White G B, Curtis C F *et al*. Inheritance and activity of some esterases associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the complex *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Bull. Entomol. Res., 1983, 73: 153

［4］ Whyard S, Downe A E, Walker V K. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex*

tarsalis. Insect Biochem. Mol. Biol., 1994, 24 (8): 819～827

[5] Whyard S, Downe A E, Walker V K. Characterization of a novel esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1995, 29 (4): 329～342

[6] Ketterman A J, Karunaratne S H, Jayawardena K G *et al*. Qualitative differences between population of *Culex quinquefasciatus* in both the esterase A2 and B2 which are involved in insecticide resistance. Pestic. Biochem. Physiol., 1993, 47: 142～148

[7] Parker A G, Campbell P M, Spackman M E *et al*. Comparison of an esterase associated with organophosphate resistance in *Lucilia cuprina* with an orthologue, not associated with resistance in *Drosophila melanogaster*. Pestic. Biochem. Physiol., 1996, 55: 85～99

[8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. J. Anal. Biochem., 1976, 72: 248～254

[9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227: 680～685

[10] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al*. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265～275

[11] Højring N, Svensmark O. Carboxylesterase with different substrate specificity in human brain extracts. J. Neurochem., 1976, 27: 523～528

[12] 陈巧云. 淡色库蚊对敌百虫抗性的研究——水解酶同敌百虫的抗性的关系. 昆虫学报, 1980, 23 (11): 350～357

[13] 朱淮民. 马拉硫磷抗性致倦库蚊酯酶单克隆抗体的制备与鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1995, 13 (1): 42～45

[14] Jayawardena K G . Determination of the role of elevated B2 esterase in insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from studies on the purified enzyme. Bull. Entomol. Res., 1994, 84: 39～44

[15] Mane S D, Tapper C S, Richmond R C. Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XIII purification and characterization of the two major isoforms. Biochem. Genet., 1983, 21: 1 019

[16] Aldridge W N. Serum esterases. Biochem. J. 1953, 53: 110

[17] Karunaratne S H, Hemingway J, Jayawardena K G *et al*. Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterase from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquito. J. Biol. Chem., 1995, 270 (52): 31 124～31 128

[18] Hipps P P, Nelson D R. Esterase from the midgut and gastric Caecum of the American cockroach. *Periplaneta americana* (L) isolation and characterization. Biochem. Biophys. Acta, 1974, 341: 421～436

[19] Devonshire A L, Moore G D. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethrinoid resistance in peach potato aphids (*Myzus persicae*). Pestic. Biochem. Physiol., 1982, 18: 235

[20] Cuany A, Handani J, Berge J *et al*. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate-resistance *Culex* mosquitoes. Pestic. Biochem. Physiol., 1993, 45: 1～6

[21] 乔传令. 不同地域有机磷杀虫药剂抗性库蚊复合组酯酶B1扩增的研究. 昆虫学报. 1996, 39 (3): 225～231

[22] Chen Q Y. Proceedings XIX International Congress of Entomology. Beijing, China. 1992. 542d

Purification and biochemical property of resistance related carboxylesterase in mosquito *Culex pipiens pallens*

LIANG Jun, SHEN Jian-hua, LIN Guo-fang, FU Wen-jun

(Shanghai Institute of Entomology, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract: In *Culex pipiens*, resistance to organophosphate insecticides was recognized to be corre-

lated with the increased non-specific esterase activity. From a dipterex-resistant mosquito strain (RD) of *Culex pipiens pallens* a special protein band was confirmed on SDS/PAGE spectrum. The identified band was not detectable in the susceptible strain (S) or the resmethrin-resistant strain (PY). This band represented a protein of MW 66 kD with pI value 4.6, which displayed carboxyesterase activity and accounted for 2.1% of the total extractable proteins. The purification of this protein was performed in turn by phenyl-sepharose (CL-4B), DEAE-cellulose (DE-5L) and FPLC column chromatographic procedures. Enzymological kinetics demonstrated a K_m value of 64.1 mmol/L and a V_{max} value of 249.8 mmol/(L·mg·min) with α-naphthol acetate as substrate. Dipterex could not inhibit its esterase activity, suggesting the 66 kD protein to be an A-esterase. Comparing with other esterase, it had lower K_m value and V_{max} value (except higher V_{max} value than B-esterase). Further study exhibited that the 66 kD protein might play a role in insect resistance to organophosphate insecticide, mainly through sequestration effect. Nevertheless, the role of hydrolyzing activity at a minor extent could not be excluded.

Key words: *Culex pipiens pallens*; insecticide resistance; carboxylesterase; purification; enzyme kinetics; sequestration